

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21720061152191

UDC \_\_\_\_\_

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

# 人 Pygopus2 的 NHD 结构域与 HMT 复合体的相互作用

Interaction of hPygopus2 NHD Domain with HMT Complexes

王 丽

指导教师姓名: 李博安 教授 博导

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2009 年 4 月

论文答辩时间: 2009 年 6 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2009 年 6 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

## 中文目录

摘 要 .....	VII
Abstract.....	VIII
第一章 绪论 .....	1
1.1 Wnt信号转导通路 .....	1
1.1.1 Wnt信号转导通路概述 .....	1
1.1.2 Wnt信号转导通路的发现与研究意义 .....	1
1.2 经典Wnt信号转导通路与Pygopus .....	1
1.2.1 经典Wnt信号转导通路概述 .....	1
1.2.2 Pygopus与经典Wnt信号转导通路 .....	2
1.3 Pygopus与乳腺癌 .....	4
1.3.1 Wnt信号转导通路 with 乳腺癌 .....	4
1.3.2 Pygopus与乳腺癌 .....	5
1.4 组蛋白甲基化转移酶（HMT） .....	5
1.4.1 组蛋白修饰与基因转录激活 .....	5
1.4.3 组蛋白甲基化修饰 .....	6
1.4.4 Wnt信号转导通路 with 组蛋白修饰相关蛋白复合体 .....	7
1.5 本课题的主要目的与技术路线 .....	7
1.6 RNA干扰技术（RNAi）基本原理 .....	8
第二章 材料与方法 .....	10
2.1 基因相关实验材料与方法 .....	10
2.1.1 实验材料 .....	10
2.1.2 实验方法 .....	11
2.2 细胞培养相关实验材料与方法 .....	14
2.2.1 实验材料 .....	14
2.2.2 实验方法 .....	15
2.3 蛋白相互作用相关实验材料与方法 .....	16
2.3.1 实验材料 .....	16

2.3.2 实验方法.....	19
<b>2.4 RNA干扰实验材料与方法.....</b>	<b>22</b>
2.4.1 实验材料.....	22
2.4.2 RNA干扰序列设计.....	22
2.4.3 pSUPER重组质粒构建.....	23
2.4.4 RNA干扰效果的鉴定。.....	24
<b>第三章 实验结果.....</b>	<b>25</b>
3.1 重组质粒构建.....	25
3.2 RNA干扰实验结果.....	26
3.3 人Pygopus2 参与H3K4 甲基化修饰过程.....	28
3.3.1 人Pygopus2 通过NHD结构域与多个MLL相关复合体组分相互作用.....	28
3.3.2 人Pygopus2 参与了MLL复合体对组蛋白H3K4 的甲基化修饰.....	33
<b>讨 论.....</b>	<b>36</b>
<b>展 望.....</b>	<b>43</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>44</b>
<b>附 录.....</b>	<b>50</b>
附录 1 pCMV-myc质粒及其多克隆位点图谱.....	50
附录 2 pCMV-HA质粒及其多克隆位点图谱.....	51
附录 3 pSUPER.basic质粒及其多克隆位点图谱.....	52
<b>致 谢.....</b>	<b>53</b>

## Table of Contents

<b>Abstract (Chinese).....</b>	<b>IV</b>
<b>Abstract (English).....</b>	<b>IV</b>
<b>Chapter 1 Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Wnt signaling pathway.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Wnt signaling pathway introduction.....	1
1.1.2 Research significance of Wnt signaling pathway.....	1
<b>1.2 Canonical Wnt signaling pathway and Pygopus.....</b>	<b>1</b>
1.2.1 Canonical Wnt signaling pathway.....	1
1.2.2 Pygopus in canonical Wnt signaling pathway.....	2
<b>1.3 Pygopus and breast cancer.....</b>	<b>4</b>
1.3.1 Wnt signaling pathway and breast cancer.....	4
1.3.2 Pygopus and breast cancer.....	5
<b>1.4 Histone Methylation Transferase (HMT).....</b>	<b>5</b>
1.4.1 Histone modification and gene transcription.....	5
1.4.2 Histone methylation.....	6
1.4.3 Wnt signaling pathway and histone modification complexes.....	7
<b>1.5 Purpose and methods of my research.....</b>	<b>7</b>
<b>1.6 Mechanism of RNA interference.....</b>	<b>8</b>
<b>Chapter 2 Materials and methods.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Cloning experiments.....</b>	<b>10</b>
2.1.1 Materials.....	10
2.1.2 Methods.....	11
<b>2.2 Cell culture.....</b>	<b>14</b>
2.2.1 Materials.....	14
2.2.2 Methods.....	15
<b>2.3 Western Blotting and CoIP.....</b>	<b>16</b>
2.3.1 Materials.....	16

2.3.2 Methods.....	19
<b>2.4 RNA interference.....</b>	<b>22</b>
2.4.1 Materials.....	22
2.4.2 RNA interference sequence design.....	22
2.4.3 Construction of pSUPER plasmids.....	23
2.4.4 Detect RNA interference efficiency by Western Blotting.....	24
<b>Chapter 3 Results.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Construction of myc/HA-hpy2-NHD.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2 RNA interference.....</b>	<b>26</b>
<b>3.3 hPygopus2 involves in H3K4 methylation.....</b>	<b>27</b>
3.3.1 hPygopus2 NHD domain interacts with many MLL complexes components.....	32 35
3.3.2 hPygopus2 plays a role in H3K4 methylation by MLL complexes.....	42 43
<b>Discussion.....</b>	<b>49</b>
<b>Prospects.....</b>	<b>49</b>
<b>Reference.....</b>	<b>50</b>
<b>Appendices.....</b>	<b>51</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>52</b>

## 摘 要

Wnt 信号通路控制多种细胞的命运, 参与细胞的增殖、分化、凋亡等基本过程, 在正常组织发育以及肿瘤形成中都起着非常重要的作用。经典 Wnt 信号转导通路, 通过关键因子  $\beta$ -catenin (果蝇中为 Armadillo) 对靶基因转录进行调控。WNT 信号存在的情况下,  $\beta$ -catenin 进入核内, 与 TCF 结合, 并募集许多转录激活相关因子, 从而激活靶基因转录。pygopus 通过 PHD 与 Lgs/BCL9 直接结合, 并由此与  $\beta$ -catenin 的 N 端间接结合。目前已经证实  $\beta$ -catenin 与某些组蛋白甲基化转移酶 (HMT) 复合体成员有关, 并且这种相互作用是  $\beta$ -catenin 参与 Wnt 靶基因转录激活的关键机制。染色体重组相关蛋白复合体 HMT 可以对组蛋白尾部氨基酸残基进行甲基化修饰, 这些修饰可以影响组蛋白与 DNA 的亲水性, 从而改变染色体的结构, 使其处于相对松弛的状态, 以便于转录因子与 DNA 的结合及其它蛋白质因子的相互作用。本实验室已经通过串联亲和层析 (Tandem Affinity Purification, TAP) 技术发现了若干与 Pygopus2 的 N 端存在相互作用的蛋白, 其中包括一些 H3K4 HMT 蛋白复合体的成员。本文采用 RNA 干扰技术、GST-PULL DOWN、免疫共沉淀及蛋白免疫印迹技术, 对 Pygopus2 的 N 端与多个 HMT 蛋白之间的相互作用进行鉴定和分析, 确定人 Pygopus2 的 NHD 结构域与多个 HMT/HAT 复合体组分存在相互作用, 其中包括 HMT 复合体组分 WDR5、RbBP5、ASH2L、MLL2、Menin, 并进一步确定了这些蛋白与 NHD 结构域的结合位点。另外也证实了在乳腺癌细胞中, 人 Pygopus2 能够与 H3K4me2 和 H3K4me3 在体内结合, 并进一步证实外源的 NHD 结构域能够与 H3K4me2 和 H3K4me3 结合, WDR5 对组蛋白的甲基化修饰也需要 Pygopus 的参与。一系列的实验揭示了人 Pygopus2 的 NHD 结构域在 WNT 的靶基因转录激活中可能起着重要作用, 这对于深入了解 NHD 结构域的功能, 以及更彻底了解 WNT 机制都有着重要意义。

### 关键词

Pygopus2 NHD 结构域; Wnt 信号转导通路; 组蛋白甲基化转移酶; H3K4



## **Abstract**

Wnt signalling pathway plays a significant role in determining cell fate and cell growth, differentiation, apoptosis, which is also very important during the normal tissue development or tumorigenesis. In canonical Wnt pathway, the key effector is  $\beta$ -catenin, which is transported into nucleus and binds with TCF, recruiting many transcription factor and finally regulating the target gene expression. Lots of studies show that  $\beta$ -catenin can recruit some HMT complexes and such interaction is the basic activation mechanism of Wnt target gene transcription. As the dense chromatin folding of the genome does not allow the access of these sites by the huge multiprotein transcription machinery, remodelling is required to loosen up the chromatin structure for successful transcription initiation. After we got the TAP result, which showed that hPygopus2 can bind with many H3K4 HMT complexes, including the HMT complex components of WDR5, RbBP5, ASH2L, MLL2, Menin, and the binding site is included in 1-47 amino acids of NHD domain. We confirmed the interactions between hPygopus2 NHD domain and these components by co-immunoprecipitation, Western Blotting and RNA interference. And hPygopus2 NHD domain can interact with H3K4Me2 and H3K4Me3. Therefore I can make conclusion that hPygopus2 NHD domain is involved in the recruitment of the HMT components in Wnt signaling pathway, and the novel function of NHD domain may be essential for the target gene transcription of Wnt signaling pathway.

### **Key words:**

Pygopus2 NHD domain, Wnt signaling pathway; HMT; H3K4

## 第一章 绪论

### 1.1 Wnt 信号转导通路

#### 1.1.1 Wnt 信号转导通路概述

Wnt信号转导通路主要分为3种类型：(1)经典的Wnt信号转导通路(canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway)：通过 $\beta$ -catenin核易位，激活靶基因的转录活性；(2)细胞平面极性通路(The planar cell polarity pathway, PCP通路)：此通路涉及RhoA蛋白和Jun激酶，主要控制胚胎的发育时间和空间。在细胞水平上，此通路通过重排细胞骨架来调控细胞极性。(3) Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ 通路：此通路可诱导细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度增加并激活 $\text{Ca}^{2+}$ 敏感的信号转导组分，如依赖钙调蛋白的蛋白激酶II、钙调蛋白敏感的蛋白磷酸酶和活化T细胞核因子NF2AT。Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ 通路和经典Wnt信号转导通路相互作用，但此通路在动物中是否保守以及在肿瘤发生中是否有意义目前还不清楚<sup>[1]</sup>。

#### 1.1.2 Wnt 信号转导通路的发现与研究意义

Wnt信号转导通路研究始于果蝇遗传分析与非洲爪蟾胚胎模型的相关研究结果。对果蝇胚胎发育的研究中发现了无翅基因(wingless)<sup>[2]</sup>。随后对小鼠乳腺肿瘤病毒的研究中发现了前病毒整合、激活的癌基因即为整合基因(int)<sup>[3]</sup>。之后的研究证明果蝇的int基因就是wingless，因此将两个基因统一命名为Wnt基因家族<sup>[4-6]</sup>。

Wnt信号通路控制多种细胞的命运，参与细胞的增殖、分化、凋亡等基本过程，在正常组织发育以及肿瘤形成中起着重要作用<sup>[7-9]</sup>。

### 1.2 经典 Wnt 信号转导通路 Pygopus

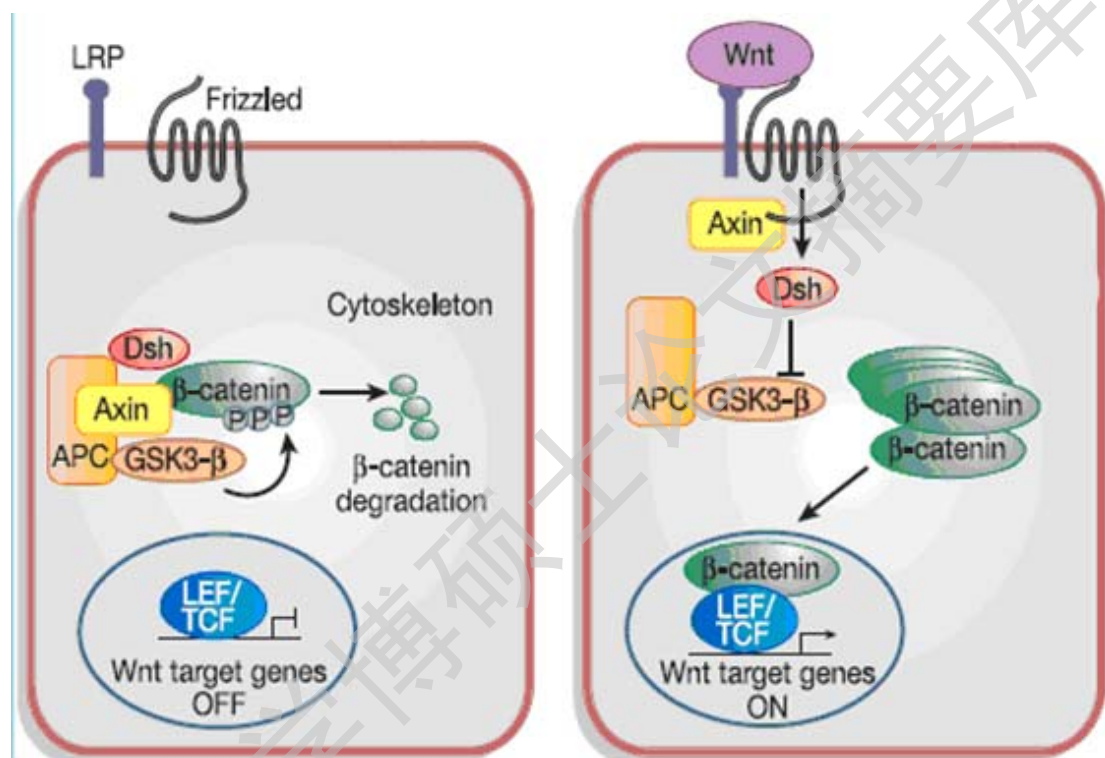
#### 1.2.1 经典 Wnt 信号转导通路概述

经典Wnt信号转导通路，通过关键因子 $\beta$ -catenin（果蝇中为Armadillo）对靶基因转录进行调控。在没有Wnt信号的情况下，由Axin、APC、GSK3 $\beta$ 、CK1、PP2A组成的蛋白复合体(destruction complex)持续降解胞浆内的 $\beta$ -catenin，使其保持较低的蛋白水平。细胞接受Wnt信号后，Axin从该蛋白复合体中脱离，复合体由此解散， $\beta$ -catenin不再被降解，并在胞浆内不断积累，最终进入核内。进入核内的 $\beta$ -catenin与T细胞因子/淋巴细胞增强因子(T cell factor/lymphoid

enhancer factor, TCF /LEF) 家族成员蛋白相互作用, 形成一个双向调节转录因子<sup>[10]</sup>。

图表 1-1 Wnt 信号通路示意图, 分别为无 Wnt 信号刺激和有 Wnt 信号刺激时经典 Wg/Wnt 信号通路情况

Figure1.Schematic of canonical Wg/Wnt signaling. In the absence of Wnt signaling (left panel) . In the presence of Wnt signaling (right panel)



### 1.2.2 Pygopus 与经典 Wnt 信号转导通路

2002 年, 果蝇中发现了一个存在于 $\beta$ -catenin下游的新的功能蛋白, 即Pygopus (Pygo) 蛋白。果蝇Pygopus的突变将产生与Wg缺失的同等表型, pygopus通过PHD与Lgs/BCL9 直接结合, 并由此与 $\beta$ -catenin的N端间接结合。目前为止, Lgs/BCL9 被证实是一个接头蛋白连接Pygo和 $\beta$ -catenin, 它本身并没有转录激活功能<sup>[11, 12]</sup>。野生型果蝇中Leg在核中表达, 只有Pygopus敲除, Leg才会在胞浆内堆积, 但Leg敲除的果蝇中, pygo仍然表达在核中, 由此可以推断, Pygopus具有可以直接结合并锚定Leg/BCL9 定位于核中的作用, 但Leg/BCL9 对pygo没有同样的锚定作用

小鼠体内pygopus的研究发现了哺乳动物Wnt信号通路中Pygopus蛋白的重要性<sup>[13-15]</sup>。与果蝇不同的是, 哺乳动物体内有两种pygopus基因的同源蛋白, 分别

是Pygopus1 和Pygopus2<sup>[16, 17]</sup>。Pygopus1 在胚胎期表达及其微弱, 成年时只有在心脏中表达。而Pygopus2 在胚胎早期就有表达, 并广泛分布于各种组织, 因此, Pygopus2 是主要的效应蛋白<sup>[18]</sup>。

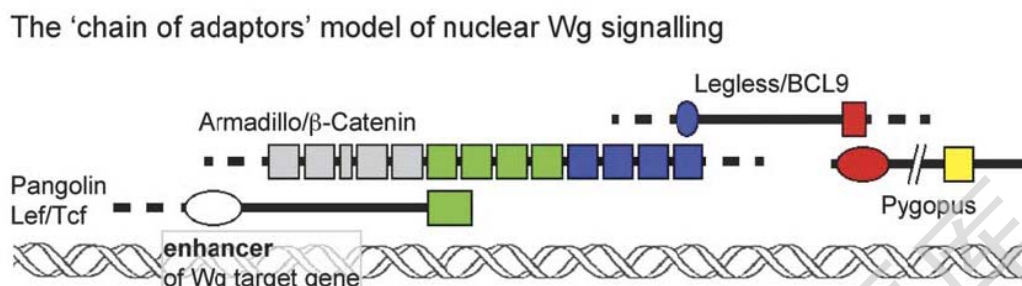
Pygopus蛋白有两个独特的保守区域, 一个是N端同源序列(NHD, N-terminal homology domain) 和C端PHD (plant homology domain) 锌指结构<sup>[19-21]</sup>。这两个结构域对Pygo蛋白功能的发挥都相当重要。

PHD结构域的三级结构中包括 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠等结构, 两个锌离子在里面起到稳定二级结构的作用。比较人和小鼠的Pygo基因可以发现, Pygopus1 具有完全一致的同一性, 而Pygopus2 只有 84%的序列同一性, 其中PHD结构域是高度保守区域。PHD结构域的部分氨基酸突变不仅影响Pygo的二聚体形成, 而且也影响其和Lgs/BCL9 的结合。目前广泛认为Pygopus蛋白PHD锌指结构的功能是与Lgs/BCL9 相连接, 从而与 $\beta$ -catenin相互作用。PHD锌指结构对Lgs/BCL9 的连接作用是充分也是必要的。无论体内还是体外, 果蝇和小鼠PHD结构域表面的四个保守位点对Pygopus与Legless结合都是必须的。此外, 这四个位点对转染后的哺乳动物细胞中与DNA结合的Pygo发挥转录活性以及拯救Pygopus突变的胚胎都至关重要<sup>[22]</sup>。

Pygopus的NHD结构域是pygopus所独有的结构域, 具体功能尚不清楚。有实验证明其具有转录激活功能。在哺乳动物 293T细胞中, 把果蝇Pygopus的N端(包括NHD) 与GAL4 DNA结合域融合, 能够激活报告基因转录<sup>[23]</sup>, 这表明当NHD结构域直接与DNA结合域融合后会有转录激活的效应。进一步研究发现, 报告基因的激活高度依赖于NHD结构域的一段保守的NPF氨基酸序列<sup>[24]</sup>。NHD结构域如何在依赖 $\beta$ -catenin和不依赖 $\beta$ -catenin的情况下激活基因转录, 其具体机制仍有待研究。最新研究表明Mediator complex中的成员Med12 和Med13, 在果蝇中编码Kohtalo和Skuld蛋白, Pygo 的NHD结构域与这两种蛋白有相互作用。而Mediator complex本身具有直接结合RNA聚合酶 II, 招募其定位到DNA上进行下游基因的转录的功能, 因此Pygopus有可能是通过这种机制调控下游Wg靶基因转录<sup>[107]</sup>。

图表 1-2 在核内，Pygopus 与  $\beta$ -catenin 通过 Legless/BCL9 相互作用

Figure 1-2 The 'chain of adaptors' model of nuclear Wg signaling<sup>[25]</sup>



### 1.3 Pygopus 与乳腺癌

#### 1.3.1 Wnt 信号转导通路与乳腺癌

研究发现许多调节细胞增殖、分化、肿瘤发生基因受Wnt经典信号通路转录调控，如c-myc和cyclinD1，这两个Wnt经典信号通路的靶基因都能在细胞周期中加速G1/S期的进程<sup>[38]</sup>。此外，Wnt经典信号通路还能诱导生长因子及其受体的表达，从而影响细胞增殖。例如在胃癌、结肠癌中发现生长因子FGF表达上升，而FGF的启动子可以被TCF激活<sup>[39]</sup>。除影响细胞周期外，Wnt经典信号通路还可以调控细胞凋亡，例如抗凋亡基因survivin的启动子区也有TCF-4的结合位点，APC的突变可以上调survivin基因的表达<sup>[40]</sup>等。此外有研究发现，Wnt经典信号通路诱导蛋白Wnt-1、下游基因相应蛋白WISP-1与细胞内survivin、cyclinD1的相互作用可能加速细胞周期，细胞增殖和细胞凋亡，这在结肠癌的发生中有重要的意义<sup>[43]</sup>。关于Wnt信号通路与肿瘤的研究，很多是在结肠腺癌和结肠癌中，这些癌中广泛存在APC和 $\beta$ -catenin突变，而后在子宫内膜癌，前列腺癌，甲状腺癌和一些间叶细胞起源的肿瘤中也有发现 $\beta$ -catenin、APC以及Axin等Wnt经典信号通路中成分的异常<sup>[44]</sup>。

乳腺癌的发生是一个多因素参与、多阶段、多基因异常的复杂生理过程。抑癌基因的失活会导致乳腺癌的敏感性，而癌基因的异常活化则加速细胞的恶性增殖。早在20多年前，对小鼠乳腺癌进行的研究就发现Wnt-1是老鼠乳腺肿瘤病毒（MMTV，Mouse Mammary Tumor Virus）的整合位点之一，从而发现了Wnt信号通路与肿瘤密切相关<sup>[58]</sup>。细胞内Wnt-1基因的表达可激活自身及邻近细胞膜上的Wnt蛋白受体，引起乳腺上皮细胞的恶性转化<sup>[26]</sup>。随后在乳腺纤维增生症及乳腺癌中也发现了Wnt-2基因的过度表达<sup>[27]</sup>；乳腺纤维增生症及乳腺癌中

存在Wnt-5a 的过度表达<sup>[28]</sup>。另外, Wnt-1 和Wnt-10b 在转基因小鼠乳腺中的表达也会导致乳腺小叶中小泡的增生, 大大增加乳腺癌患病风险<sup>[29]</sup>。E-cad的表达下降则在乳腺癌的发生和发展中起到加速癌细胞的增殖和促进癌细胞侵袭转移的作用<sup>[59]</sup>。

有研究表明,  $\beta$ -catenin的异常表达与乳腺癌的发生有关: 正常乳腺组织中的 $\beta$ -catenin的表达主要集中于细胞膜, 胞浆与核内的表达水平很低, 但在乳腺癌组织中, 则主要集中表达于胞浆或核内, 这表明乳腺癌组织中存在着异常的Wnt信号转导通路, 胞浆内积累的游离 $\beta$ -catenin可能通过激活靶基因的过度表达, 引起细胞增殖分化失调, 从而促使乳腺组织的癌变<sup>[60]</sup>。

22%的乳腺癌患者体内存在myc 基因过度表达的情况。细胞水平的研究也得到了相似结论: 在培养的鼠肠上皮细胞和乳腺细胞中加入过量的ILK激酶, 会导致细胞膜上的E-cadherin 蛋白减少, 大量 $\beta$ -catenin 进入细胞核, 激活Tcf/Lef 转录因子, myc基因开始非正常转录, 从而引发癌症<sup>[30, 31]</sup>。

### 1.3.2 Pygopus 与乳腺癌

人Pygopus2 在正常成体细胞的胞浆中通常保持较低水平, 研究发现其在乳腺癌组织及乳腺癌细胞系的核内表现为异常的高表达水平(正常乳腺细胞中并非如此)。有实验证实, Pygopus2 对于Wnt靶基因Cyclin D1 的表达和乳腺癌细胞生长是必需的<sup>[32]</sup>。

## 1.4 组蛋白甲基化转移酶 (HMT)

### 1.4.1 组蛋白修饰与基因转录激活

染色质和染色体是细胞核中同种物质的不同形态, 由基本组成单位核小体经螺旋、盘绕、压缩而成<sup>[33]</sup>。核小体的中部是由四种组蛋白 (H2A、H2B、H3、H4) 各两个分子构成的八聚体, N端尾部为单一的H1, 核小体周围绕着两圈长约 166bp的DNA, 之间的连接DNA约 10-80bp, 并通过组蛋白H1 缩成直径为 30nm 的纤丝<sup>[34]</sup>。核小体的结构成为各类转录因子与DNA结合的主要障碍。实验证实, 核小体为基因转录的一个通用抑制子<sup>[35]</sup>。

要实现基因的表达, 处于高度螺旋状态的染色质必须发生构型改变, 使其处于相对松弛的状态, 以便于转录因子与 DNA 的结合及其它蛋白质因子的相互作用, 此过程即为染色质构型重建。

核小体核心组蛋白的尾部常发生翻译后修饰,包括甲基化、磷酸化、乙酰化、泛素化和ADP核糖基化等。这些修饰可以影响组蛋白与DNA的亲合性而改变染色质的状态,也可以影响转录因子与DNA序列的结合<sup>[36, 37]</sup>。

### 1.4.3 组蛋白甲基化修饰

组蛋白的甲基化通常发生在组蛋白 N 端的赖氨酸或精氨酸残基上,并因此体现包括转录激活或抑制在内的多种生物学效应。研究认为组蛋白的甲基化修饰可能通过特异性识别甲基化残基的效应蛋白而实现,这些效应蛋白可能起到衔接作用,也可能这些蛋白本身即是某些重要生命过程中的关键因子,从而表现出对染色体功能的调控。组蛋白精氨酸甲基化主要由 PRMT (protein arginine methyltransferase) 家族的部分成员完成。组蛋白赖氨酸的甲基化是由不同的特异的组蛋白赖氨酸甲基转移酶 (histone lysine(K)methyltransferases, HKMTs) 催化的。其中主要由包含 SET 结构域的甲基转移酶催化完成,但也有研究报道说酵母中是以 Dot1 以及其哺乳类同源物 DOTIL 以非 SET 结构域来催化甲基化过程的。通常 H3K4、H3K36、H3K79 的甲基化与染色质的激活区域相关,而 H3K9、H3K27 及 H4K20 的甲基化与染色质上的沉默区域相关。

H3K4me2 和 H3K4me3 主要存在于激活状态的基因中,但它们的功能不尽相同。H3K4me2 除了与基因的转录激活有关之外,还与调节转录的平衡有关。在酿酒酵母 *S.cerevisiae* 的基因中, H3K4me2 可以在整个基因任何一个部位出现,尤其在编码区的中部 H3K4me2 水平达到最高。脊椎动物中,大部分的 H3K4me2 与 H3K4me3 并存,分散在基因中的不同区域,多为高表达基因的近端 5-20 个核小体内。H3K4me2 区域在有的基因中的不在转录的起始点的现象可能是在决定染色体的种族特异性时起一定的作用。H3K4me3 与基因的转录激活并存,基因 5'端的高水平的 H3K4me3 与基因的激活有很大的关联。

组蛋白 H3K4 的甲基化与染色体的转录活性区域有紧密的联系,酵母中仅有一种 H3K4 的 HMT,即 Set1。在高等脊椎动物中,则包括更多与 Set1 相似的蛋白复合体,在哺乳动物中,已经鉴定出六种 Set1 家族成员: Set1A、Set1B 以及四种 MLL 家族蛋白。上述全部的 HMT 均有针对 H3K4 的 HMT 活性,并在基因转录激活过程中起着重要作用。

SET结构域由最早发现表达这个结构域的 3 个基因来命名,分别为Su (var)

3-9、Enhancer of zeste (E(z)) 和trithorax (trx)<sup>[41]</sup>。由于修饰组蛋白的酶可以改变染色体结构,进而影响基因的表达,因此SET蛋白一旦发生失调,常引起细胞恶性转化,增生,导致肿瘤的发生。哺乳动物组蛋白甲基化转移酶的SET结构域主要由核心SET结构域、pre-SET结构域和post-SET结构域组成,核心SET结构域的侧面与pre-SET结构域和post-SET结构域相连接。pre-SET结构域的主要作用是维持整个蛋白结构的稳定性,post-SET结构域则参与构成部分酶活位点<sup>[42]</sup>。

其中组蛋白H3K4 甲基化酶主要为MLL (mixed lineage leukemia) 家族蛋白,包括MLL1、MLL2、MLL3、MLL4、SET1A和SET1B以及ASH1。研究报道MLL1和MLL2 在发育过程中对于长期维持Hox基因的表达形式有重要作用,同时在小鼠中敲除MLL1 的SET结构域后可导致缺陷表型的产生,表明H3K4 的甲基化对于调节表观遗传记忆有重要作用。此外,MLL1 基因的重排与白血病有相互关联。研究表明,MLL家族的甲基转移酶以多蛋白复合体的形式存在并发挥作用,MLL家族共同且主要的复合体内成员包括WDR5、RbBP5 以及ASH2<sup>[43-49]</sup>。

#### 1.4.4 Wnt 信号转导通路 with 组蛋白修饰相关蛋白复合体

$\beta$ -catenin进入核内以后,被TCF募集,并将许多基因转录激活相关蛋白募集到靶基因启动子上,其中即包括组蛋白修饰复合体。体外实验证实 $\beta$ -catenin的C端转录活性结构域可以与MLL1/MLL2 染色体修饰复合体结合。而体内实验证实了 $\beta$ -catenin能够促进c-myc基因的H3K4 三甲基化<sup>[50]</sup>。

### 1.5 本课题的主要目的与技术路线

目前已经证实  $\beta$ -catenin 与某些 HMT 复合体成员有关,并且这种相互作用是  $\beta$ -catenin 参与 Wnt 靶基因转录激活的关键机制。 $\beta$ -catenin 进入核内之后,与 TCF 结合,并由此募集许多染色体修饰相关蛋白参与染色体重组和组蛋白修饰,从而能够激活靶基因转录。Pygopus 的 PHD 结构域被认为也能够与修饰过的组蛋白相结合,并在转录激活过程中起到“定位”和“解码”的功能。但关于 Pygopus 的 NHD 结构域在此过程中起着怎样的作用,尚不清楚。

本实验室已经通过串联亲和层析 (tandem affinity purification, TAP) 技术发现了若干与 Pygopus2 的 N 端存在相互作用的蛋白,其中包括一些 HMT 蛋白复合体的成员。本文主要采用 RNA 干扰技术、GST-PULL DOWN、免疫共沉淀及蛋白免疫印迹技术,对 Pygopus2 的 N 端与多个 HMT 蛋白之间的相互作用进行



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库